

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-227938
(43)Date of publication of application : 08.10.1991

(51)Int.Cl.

A61K 35/78
A61K 31/09
// C07C 43/23

(21)Application number : 02-022708

(71)Applicant : KANEBO LTD

(22)Date of filing : 01.02.1990

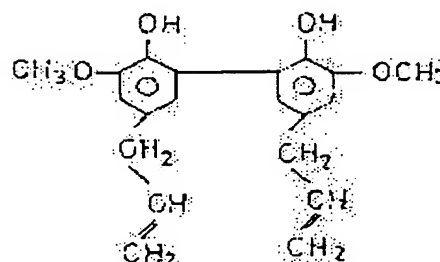
(72)Inventor : TAIRA ATSUSANE

(54) ACTIVE OXYGEN-ELIMINATING AGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an active oxygen-eliminating agent having direct trapping action to active oxygen, especially to OH radical acting a strong biological action comprising clove oil or dehydrodieugenol as a fractionated component of said oil.

CONSTITUTION: The aimed active oxygen-eliminating agent is composed of clove oil as an essential oil obtained by steam distillation of a bud of Eugenia Caryophyllate occurring in Madagascar or southeast Asia, etc., or dehydrodieugenol expressed by the formula obtained by distilling said essential oil, eluting a residual fraction of said oil with silica chromatography and further purifying a resultant ethyl acetate fraction with silica chromatography. As removable active oxygen-generating system, Fenton system generating OH radical or hypoxanthine-xanthine oxidase system generating superoxide anion, etc., is exemplified and may be poured into said generating system.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-227938

⑬ Int.Cl.⁵

A 61 K 35/78

31/09

// C 07 C 43/23

識別記号

AED C

D

庁内整理番号

8412-4C

6971-4C

7188-4H

⑭ 公開 平成3年(1991)10月8日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 活性酸素消去剤

⑯ 特 願 平2-22708

⑰ 出 願 平2(1990)2月1日

⑱ 発 明 者 平 良 淳 誠 神奈川県秦野市千村160番地の10 コーポ野鳥101号室

⑲ 出 願 人 鐘 紡 株 式 会 社 東京都墨田区墨田5丁目17番4号

明 細 書

1. 発明の名称

活性酸素消去剤

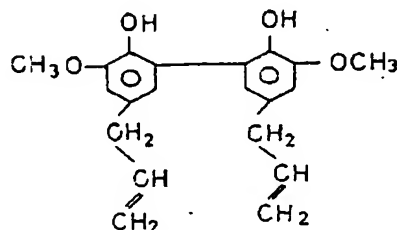
2. 特許請求の範囲

- (i) クローブ油又はDehydrodieugenol(デハイドロジオイゲノール)から成る生体内の活性酸素消去剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、クローブ油及びその精製して得るデハイドロジオイゲノールによる生体内の活性酸素消去剤に関する。下記にその構造式を示す。



(従来の技術)

最近、活性酸素やフリーラジカルが生体膜、組織に障害を与え、これが種々の疾病をはじめ、老化とも関連することを示す多くの臨床報告がある。生体内での活性酸素には $\cdot\text{O}_2$ の1, 2, 3電子還元分子種である $\text{O}_2^{\cdot-}$ (スーパーオキシドアニオンラジカル)、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ (OHラジカル)及び励起状態の $^1\text{O}_2$ がある。また脂質の過酸化で生じるペルオキシラジカルやアルコキシラジカルが知られている。

一方、生体は常に酸素に被曝されている状態であるため酵素的防御機構を持っている。

例えばスーパーオキシドアニオンラジカルに対して不均化反応を行うスーパーオキシドディスムターゼ(Superoxide Dismutase, SOD)があり、これを有効成分とする生体内活性酸素に由来する障害の予防及び治療剤も知られている。

またビタミンC、ビタミンEが抗酸化性のある点より、活性酸素フリーラジカルを消去する物質として試験されてきた。

しかし、スーパーオキシドデイスムターゼはその製造法が困難で、また原料の入手も制限があり、さらに安定性及び安全性にも問題が残る。またビタミンBやビタミンCは生体を用いた実験で、安定性や活性酸素消去作用が十分ではない等の欠点が残る。

また、OHラジカルについては特に活性酸素種としての反応性が高くかつ上述酵素のような生体での特定の防御機構を持っていない。

以上のことから、活性酸素、特に強力な生物作用をするOHラジカルに対し直接的な捕捉作用を有する消去剤の要望が強く望まれている。

〔発明が解決しようとする課題〕

従って本発明の目的は、活性酸素、特に強力な生物作用をするOHラジカルに対し、直接的な捕捉作用を有する、活性酸素消去剤を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、クローブ油又はDehydrodieugenol(デハイドロジオイゲノール)から成る生体内の

活性酸素消去剤である。

本発明で用いられるクローブ油は、マダガスカルや東南アジア等に産するEugenia Caryophyllataのつぼみを水蒸気蒸留して得られる精油で、古くから食品用香料として用いられている。

本発明で用いられるデハイドロジオイゲノールは、この精油を蒸留し、その残留画分につきシリカゲルクロマトグラフィーにより抽出した酢酸エチルフラクションをさらにシリカゲルクロマトグラフィーにより精製して得られる公知の化合物である(藤田 他:日本化学雑誌, 87巻, 9号, p110-112, 1966)。

本発明の活性酸素消去剤の使用方法は、クローブ油又はデハイドロジオイゲノールを活性酸素発生系に、直接投入すればよい。消去可能な活性酸素発生系としては、OHラジカルを発生するフェントン系、スーパーオキシドアニオンを発生するヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系等がある。

次にクローブ油及びデハイドロジオイゲノールの活性酸素消去作用の効

- 3 -

果を明らかにする実施例を示す。

〔実施例〕

実施例1: デオキシリボース法による、OHラジカル捕捉能の測定

<原理>

本方法は、フェントン系にてOHラジカルを発生させ、そのOHラジカルとデオキシリボースとの反応($3.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$)により生じるマロンジアルデヒド(MDA)をチオバルビツール酸と反応させた時に生成する反応物を測定(TBA法)し、TBA値を求めるものである(Barry Halliwell, John M.C. Gutteridge, Okezie I. Aruoma: Analytical Biochemistry, 165, 215-219, 1987を改良)。

即ちこの系にOHラジカルの捕捉物質が存在するとTBA値が低下することを利用し、捕捉物質添加前のTBA値に対し添加後のTBA値から阻害率を求め、OHラジカル阻害活性値として示した。

<方法>

- 5 -

- 4 -

KH₂PO₄-KOH緩衝液(pH 7.4)に、デオキシリボース、クローブ油或いはデハイドロジオイゲノール、EDTA、アスコルビン酸、FeCl₃、過酸化水素を溶解させ、反応組成液を調製する。

使用した試薬各々の反応組成液中の最終濃度を第1表に示す。

第 1 表

| 試 薬 | 最終濃度 |
|---|---------|
| KH ₂ PO ₄ -KOH緩衝液 | 0.2 M |
| デオキシリボース | 2.8 mM |
| クローブ油 | 10 重量% |
| デハイドロジオイゲノール | 2.00 μM |
| EDTA | 104 μM |
| アスコルビン酸 | 100 μM |
| FeCl ₃ | 100 μM |
| 過酸化水素 | 100 μM |

この反応液を37℃で60分間インキュベーション後、TBA法にてチオバルビツール酸-

- 6 -

M D A アダクト (吸光度 532 nm) の測定をした。

この方法により得られたクローブ油並びにデハイドロジオイゲノールの、OHラジカル阻害率を次式によって算出し、第2表に示した。

$$\text{阻害率}(\%) = \left(1 - \frac{A}{A^0}\right) \times 100$$

A : 捕捉物質添加後の吸光度

A⁰ : 捕捉物質添加前の吸光度

第 2 表

OHラジカル捕捉物質のデオキシリボース過酸化作用阻害率

| OHラジカル捕捉物質 | 阻害率 (%) |
|--------------|---------|
| クローブ油 | 76.91 |
| デハイドロジオイゲノール | 74.85 |

また、デハイドロジオイゲノールについては、20 μM の濃度でも同程度の阻害作用が認められることから、本物質がOHラジカル捕捉効果の極めて高い物質であるといえる。

- 7 -

ノール) を添加したときの吸光度

A 3 : キサンチンオキシダーゼの代わりに蒸留水を添加したときの吸光度

過酸化抑制率 (%)

$$= \left(1 - \frac{A1 - A3}{A2 - A3}\right) \times 100$$

第 3 表

捕捉物質の不飽和脂肪酸過酸化抑制率

| 捕 捉 物 質 | 抑制率 (%) |
|--------------|---------|
| クローブ油 | 63.6 |
| デハイドロジオイゲノール | 82.0 |

第2表の結果から、クローブ油及びデハイドロジオイゲノールは、スーパーオキシド並びに脂質の過酸化によって生じるペルオキシラジカル、アルコキシラジカルを捕捉し、脂質の過酸化を抑制していることがわかった。

実施例 3 : ミクロソーム膜脂質の過酸化抑制試験
< 方法 >

ミクロソーム膜脂質の過酸化抑制試験は、次の

実施例 2 : 不飽和脂肪酸 (リノール酸メチル) の脂質過酸化抑制作用

< 原理、方法 >

1.0 mM のヒポキサンチン 3.0 mℓ, 2.0 U / mℓ のキサンチンオキシダーゼ (バターミルク製、和光製) 0.15 mℓ, 蒸留水 0.15 mℓ, 0.1 % のトリトン X 100, 0.006 mℓ, リノール酸メチル 0.3 mℓ を順次添加した反応組成液に、クローブ油または 99.5 % エタノールに溶解した 100 mM のデハイドロジオイゲノール 0.4 mℓ を添加し、リノール酸メチルの過酸化抑制作用を測定した。尚、コントロールには捕捉物質の代わりに蒸留水を添加した。

反応液は 37℃, 24 時間振とう後、TBA 法にて過酸化物質 (TBA-MDA アダクト) を測定し、次式により過酸化抑制率を求め、その結果を第3表に示した。

A 1 : 捕捉物質添加時の吸光度

A 2 : 捕捉物質溶液の代わりに蒸留水 (デハイドロジオイゲノールの場合にはエタ

- 8 -

ようにして行った。

尚、用いた試薬各々の抑制系全体における最終濃度を第4表に示す。

磷酸緩衝液 (pH 7.4), ADP, 硫酸第一鉄, 過酸化水素から成る OHラジカル発生系に、ラット肝臓より分画したミクロソーム (0.6 mg protein) を添加し、ミクロソーム膜脂質の過酸化をおこさせる反応液を調製する。

この反応液に、クローブ油又は、エタノール 0.75 mℓ に溶かしたデハイドロジオイゲノールを添加し、最終容積 1.5 mℓ の過酸化抑制系を調製する。

(以 下 略)

- 9 -

- 10 -

第 4 表

| 試 薬 | 最 終 濃 度 |
|------------------|--------------------|
| 磷酸緩衝液 (KCI含有) | 1.0 mM (150 mM) |
| ADP | 2 mM |
| 硫酸第一鉄 | 0.1 mM |
| 過酸化水素 | 0.05 重量% |
| クロール油 | 10 重量% |
| デハイドロジオイゲノール | 2 mM |

この反応液を37℃で60分間インキュベーションし、0分及び60分後各々のミクロソーム膜脂質の過酸化作用をTBA法によって調べ、抑制率を次式によって求め、結果を第5表に示した。

ミクロソーム膜脂質の過酸化抑制率(%)

$$= \left(1 - \frac{A_3 - A_1}{A_2 - A_1} \right) \times 100$$

A₁: ミクロソーム、磷酸緩衝液の自動酸化系における吸光度

A₂: 捕捉物質の代わりに磷酸緩衝液(デハイドロジオイゲノールの場合は溶解に用い

- 11 -

上記反応液にクロール油又はデハイドロジオイゲノールを添加し、最終容積1.0 mlの過酸化抑制系を調製した。

尚、用いた試薬各々の抑制系全体における最終濃度を第6表に示す。

第 6 表

| 試 薬 | 最 終 濃 度 |
|--------------|----------|
| 磷酸緩衝液 | 1.0 mM |
| DETA PAC | 0.5 mM |
| DMPO | 1.0 mM |
| 硫酸第一鉄 | 0.1 mM |
| 過酸化水素 | 0.05 重量% |
| クロール油 | 10 重量% |
| デハイドロジオイゲノール | 0.2 mM |

反応開始後1分目に、ESR(電子スピン共鳴装置、日本電子JEOLE-FES-3X型製)を用いて、OHラジカルを分析した。

デハイドロジオイゲノールで測定した結果を第1図に示す。

- 13 -

た99.5%エタノール)を添加した完全系の吸光度

A₃: 捕捉物質を添加した完全系の吸光度

第 5 表

ミクロソーム膜脂質過酸化抑制率(%)

| 時間 | クロール油 | デハイドロジオイゲノール |
|------|-------|--------------|
| 0 分 | 0 | 2.96 |
| 60 分 | 52.98 | 61.79 |

第5表の結果から、クロール油及びデハイドロジオイゲノールは生体試料であるミクロソーム脂質の過酸化に対しても、高い抑制効果を示すことが分かった。

実施例4: ESR分析によるOHラジカル捕捉用の確認

磷酸緩衝液(pH7.4)、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DETAPAC)、5,5-ジメチル-1-ピロリジン-1-オキサイド(DMPO)、硫酸第一鉄、過酸化水素から成るフェントン系によって、OHラジカルを発生させた。

- 12 -

コントロール溶液に対するピークの抑制率をFとして、次式よりデハイドロジオイゲノールとOHラジカルとの反応速度定数を求め、OHラジカル捕捉能とし、第7表に示した。

$$K_s = \frac{K_{DMPO} \cdot F [DMPO]}{(1 - F) [S]}$$

K_s: デハイドロジオイゲノール-OHラジカル反応の反応速度定数

K_{DMPO}: DMPO-OHラジカル反応の反応速度定数(3.4 × 10⁹)

F: OHラジカルのピークの抑制率

[DMPO]: DMPO濃度

[S]: デハイドロジオイゲノール濃度

第 7 表

| 捕 捉 物 質 | K _s (M ⁻¹ sec ⁻¹) | F × 100 抑制率% |
|--------------|--|-----------------|
| クロール油 | - | 15.3 |
| デハイドロジオイゲノール | 11.38 × 10 ¹¹ | 87.0 |

- 14 -

(発明の効果)

実施例の結果から、クローブ油又はその分画成分であるデハイドロジオイゲノールから成る本発明の活性酸素消去剤は、炎症、発癌、虚血障害、放射線障害、老化、白内障、自己免疫障害の原因である活性酸素、なかでも最も反応性が高く、生体での防御機構を持たないOHラジカルに対し、直接捕捉・消去する極めて有用であることは明らかである。

特にデハイドロジオイゲノールは、皮膚感作性がない等、安全性に優れており、他の活性酸素消去剤に比べて実用的である。

4. 図面の簡単な説明

第1図(イ)は捕捉物質のかわりに水を入れた場合のESRのクロマトグラムを表し、(ロ)はデハイドロジオイゲノールを200 μ M入れた場合のESRのクロマトグラムを表す。

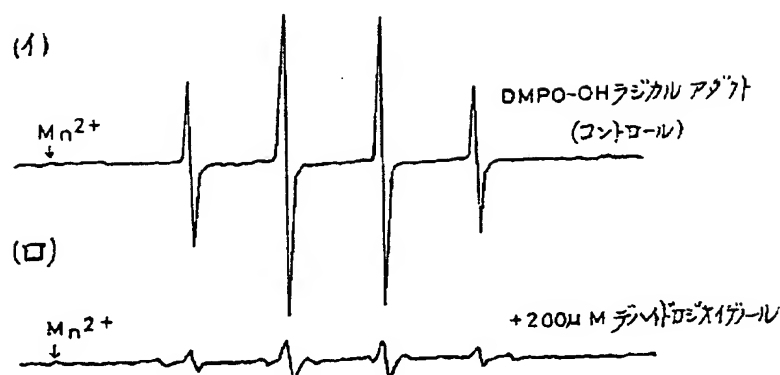
尚、標準試料としては、2価マンガンイオンを用いた。

特許出願人 綿紡株式会社



- 15 -

第1図



手続補正書 (自発)

平成 2 年 7 月 24 日

特許庁長官 植松 敏 殿



1. 事件の表示

平成 2 年特許第 2 2 7 0 8 号

2. 発明の名称

活性酸素消去剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都墨田区墨田五丁目 1 7 番 4 号

名称 (095) 鐘 紡 株 式 会 社

代表者 石 澤 一 郎



送 結 先

〒 5 3 4 大阪市都島区友割町一丁目 5 番 9 0 号

鐘 紡 株 式 会 社 特 許 部

電話 (06) 9 2 1 - 1 2 5 1

4. 補正により増加する請求項の数 なし

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

(1) 明細書第 6 頁第 1 表中の第 2 行目「0.2M」を「0.02M」と補正する。

(2) 明細書第 11 頁第 4 表中の第 6 行目「0.05 重量 %」を「14.7mM」と補正する。

(3) 明細書第 13 頁第 6 表中の第 6 行目「0.05 重量 %」を「14.7mM」と補正する。

(4) 明細書第 14 頁第 11 行目「OH ラジカルのピークの」を「DMPO-OH ピークの」と補正する。

以 上



方 式
番 査

